Stickstoffbindung durch Pilze bei gleichzeitiger Ernährung mit gebundenem Stickstoff.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOCTORWÜRDE

DER

HOHEN PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT

DER

UNIVERSITÄT BASEL

VORGELEGT VON

GEROLD STAHEL

AUS ELGG (KT. ZÜRICH)

BASEL 1911.

Stickstoffbindung durch Pilze bei gleichzeitiger Ernährung mit gebundenem Stickstoff.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOCTORWÜRDE

DER

HOHEN PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT

DER

UNIVERSITÄT BASEL

ACAD. LUGD BAT BIBL

VORGELEGT VON

GEROLD STAHEL

AUS ELGG (KT. ZÜRICH)

BASEL 1911.

Genehmigt von der mathem.-naturwissensch. Abteilung der philosophischen Fakultät auf Antrag der Herren Prof. Dr. Alfr. Fischer und Prof. Dr. H. Kreis.

Basel, den 8. Februar 1911.

Prof. Dr. Rud. Fueter,
Dekan.

Sonderabdruck aus den Jahrbüchern für wissenschaftliche Botanik, 1911, Bd. XLIX.

Die vorliegende Arbeit sollte versuchen, sowohl neue Beispiele für Stickstoffbindung durch Pilze aufzufinden, als auch einige der bereits untersuchten Arten noch einmal nachzuprüfen, um dadurch womöglich die früheren Resultate zu bestätigen. Besonders sollte aber festgestellt werden, wie die Stickstoffassimilation vom Anfangsstickstoffgehalt der Nährlösung abhängt.

Die Arbeit knüpft unmittelbar an diejenige Froehlichs (1908) an, der eine Anzahl Hyphomyceten, die auf abgestorbenen Pflanzenteilen häufig vorkommen, isolierte und quantitativ auf ihr Stickstoffbindungsvermögen untersuchte.

I. Isolierung und Kultur der Pilze auf Agar ohne Zusatz von gebundenem Stickstoff.

Die von Froehlich (08) und von mir untersuchten Pilze finden sich auf toten Pflanzenteilen: Blättern, dürren Stengeln, Baumstümpfen usw. meist in großer Menge. Das Substrat, auf dem sie wachsen, ist, im Verhältnis zu den gewöhnlich verwendeten künstlichen Nährböden, ein relativ stickstoffarmes. Es enthält nämlich auf Trockengewicht (bei 100° C getrocknet) bezogen:

Buchenlaubhumus	0,38% N	(E. Wollny 97, S. 223).
Buchenlaubstreu	1,34 „ „	(E. Ebermayer 82, S. 66).
Holzpulver	1,17 „ „	(König 03, S. 639).
Apfelbaumholz	0,90 „ „	(R. Otto 86, S. 811).
Eichenblätter	1,11 „ „	(E. Henry 97, S. 411).
Buchenblätter	0,95 „ „	(E. Henry 97, S. 411).

Auf Frischgewicht bezogen, müßten diese Werte noch etwa durch zwei dividiert werden, da frische Blätter ca. 50% Wasser enthalten.

Bei der Auswahl der Pilze wurden aus praktischen Gründen alle Basidiomyceten weggelassen. Unter den verwendeten Kulturbedingungen bringen diese meist nur Nebenfruktifikationen hervor, die sicher zu identifizieren unmöglich ist (vgl. O. Brefeld, Untersuchungen aus dem Gesamtgebiet der Mykologie Bd. 6—10).

Von Askomyceten wurden einige nicht fruktifizierende Formen weiter kultiviert, wenn sie auf dem stickstoffarmen Agar sehr gut wuchsen.

Die meisten der isolierten Pilze gehören zu den *Fungi imperfecti*.

Das von den Exkursionen mitgebrachte Material ließ sich sehr oft nicht mehr bestimmen, da die Konidien abgefallen und die Konidienträger kaum mehr zu finden waren. Solche verwelkte Rasen konnten oft wieder zur schönsten Entwicklung gebracht werden, wenn sie feucht gehalten und zugleich genügend durchlüftet wurden. Auch Sklerotien keimten unter solchen Bedingungen oft sehr schön aus.

Zum Isolieren der Pilze wurde folgendes Verfahren angewandt: Einem möglichst reinen Rasen des zu isolierenden Pilzes wurde, wenn nötig, unter dem binokularen Präpariermikroskop, mit ausgeglühtem Platindraht eine kleine Probe entnommen und meist mit einem Tropfen Wasser auf einem abgeflammten Objektträger verdünnt. Hiervon wurde eine Spur in flüssigen Agar gebracht und damit Platten gegossen. Nach 2—3 Tagen zeigten sich dann jeweils wenige, gut isolierte Rasen, die durch mehrmaliges Überimpfen leicht das Material zu den Reinkulturen gaben.

Der verwendete Agar enthielt die stickstofffreie Winogradskysche Nährlösung.

Ein Liter dieses Agars enthielt:

1 g KH_2PO_4
0,2 g $MgSO_4$
50 g Dextrose
Spuren von $FeSO_4$
„ „ NaCl
15 g Agar

Der Stickstoffgehalt des verwendeten Agars beträgt 1,65%[1]). Die Agargallerte enthält also 0,025% Stickstoff, entsprechend etwa

1) Nach einer Analyse aus dem Laboratorium des Basler Kantonschemikers.

0,175% Pepton, wenn wir nur den N-Gehalt, nicht aber den Nährwert in Betracht ziehen. Der N-Gehalt unseres Agars ist also bedeutend höher als der, den z. B. Keding verwandte und der nur 0,3% N enthielt.

Außer dem Stickstoffgehalt des Agars, konnte nur derjenige der Dextrose in Betracht kommen. Ich verwendete für die Agarkulturen eine als Dextrose purum bezeichnete Qualität[1]). Wurde die gelbbraune konzentrierte Lösung dieses Zuckers filtriert, so blieb auf dem Filter ein brauner Rückstand zurück, der aus Parenchymzellen bestand. Nimmt man in Froehlichs (08, S. 267) „blinden Versuchen" die gesamte gefundene Stickstoffmenge als aus der Dextrose stammend an, so enthielte die Dextrose purum noch etwa 0,019% Stickstoff.

Die späteren Kulturen auf sehr stickstoffarmem Substrat enthielten dagegen die als Dextrose purissimum bezeichnete Qualität. Die konzentrierte schwach gelbliche Lösung hinterließ beim Filtrieren nur einen ganz unbedeutenden Rückstand, der aus den gleichen Elementen bestand, wie bei Dextrose purum. Diese als „N-frei" bezeichnete Dextrose purissimum sicc. enthielt noch analytisch nachweisbare Spuren von Stikstoffverbindungen. Eine Analyse, die vom Adjunkten des hiesigen Kantonschemikers ausgeführt wurde, ergab einen Stickstoffgehalt von 0,002%, also gerade etwa 10mal weniger als Dextrose purum. Die Stickstoffbestimmung wurde nach Überführung in NH_4 kolorimetrisch nach Nessler ausgeführt.

Die Kulturen standen in einem Zimmer, das speziell zur Aufbewahrung von Kulturen benutzt wird. Sie vor der Aufnahme gasförmiger Stickstoffverbindungen noch besonders zu schützen, war nicht nötig, da der Stickstoffgehalt des Nährsubstrates verhältnismäßig noch hoch war.

Nur jene Formen wurden in die Reinkulturen aufgenommen, die auf diesem Agar gut gediehen. Schon auf solchem Agar schlecht wachsende Pilze zeigen nämlich auf den sehr stickstoffarmen Substraten gar keine Entwicklung mehr, wie ich das für *Gonatobotrys* feststellen konnte.

In dem folgenden Verzeichnis der isolierten Pilze wurde da, wo die Art nicht sicher festgestellt werden konnte, nur der Gattungsname angeführt.

---

1) Sämtliche für die Nährlösungen verwendeten Chemikalien stammen von E. Merk in Darmstadt.

Zahlreiche Beobachtungen meist morphologischer Natur konnten in dieser Arbeit keine Verwertung finden. Ich gedenke später einige dieser Daten zu veröffentlichen. Besonderes Interesse beanspruchen: *Monopodium uredopsis*, *Coniosporium spec.*, *Bispora molinioïdes*, *Sporoschisma nova spec.*, *Ceratocladium microspermum*, *Stysanus Echinobotryum* und eine neue Gattung aus der Gruppe der *Chalareae*. Die letztere fand bei den vorliegenden Kulturen keine Verwendung.

In der folgenden Tabelle sind die Pilze nach dem System in Rabenhorsts Kryptogamenflora geordnet. Benützen wir die oben gemachten Angaben über den N-Gehalt der Dextrose und des Agars, so enthielte der Nähragar etwa 0,025 % N, was dem N-Gehalt nach 0,175 % Kalisalpeter oder Pepton entsprechen würde.

Spezies	Fundort und Häufigkeit des Vorkommens	Wachstum auf Agar ohne Zugabe von gebundenem Stickstoff
1. *Chromosporium* spec.	Auf dürren Umbelliferenstengeln	Wächst und fruktifiziert gut
2. *Trichoderma lignorum* Tode	Auf dürren Stengeln häufig	Wächst u. fruktifiziert normal
3. *Penicillium roseum* Link.	Auf feuchten Wurzeln von *Alnus glutinosa*	Wächst und fruktifiziert gut
4. *Monopodium uredopsis* Delacr.	Auf dürren Blättern von *Lathyrus heterophyllus*	Fruktifiziert schwach. Zartes Mycel
5. *Botrytis cinerea* Pers.	—	Fruktifiziert reichlich und bildet Sclerotien (bis $^1/_2$ cm breit)
6. *Verticillium* spec.	Auf feuchtem Bauholz	Fruktifiziert normal. Sehr zartes Mycel.
7. *Acrostalagmus cinnabarinus* Corda	Auf totem Laub häufig	Fruktifiziert gut. Zartes Mycel
8. *Periconia pygnospora* Fresen.	Auf totem Laub	Großes Mycel. Steril
9. *Gonatobotrys simplex* Corda	Auf dürren Blättern von *Populus tremula*	Fruktifiziert, Mycel sehr zart
10. *Monotospora* spec.	Auf Umbelliferen-Stengeln	Steril. Mycel mit zahlreich. Sclerotien
11. *Coniosporium* spec. *(Shiraianum?)*	Auf dürren Stengeln von *Solidago virga aurea*	Fruktifiziert und wächst gut.
12. *Torula* spec.	Auf dürren Stengeln von *Heracleum*	Fruktifiziert und wächst sehr gut
13. *Hormiscium stilbosporum* Corda	Auf Coniferen-Stümpfen häuf.	Fruktifiziert sehr gut. Großes Mycel
14. *Stachybotrys lobulata* Berk.	Auf angefeuchtetem Filtrierpapier und alten Tapeten	Fruktifiziert und wächst sehr gut

Spezies	Fundort und Häufigkeit des Vorkommens	Wachstum auf Agar ohne Zugabe von gebundenem Stickstoff
15. *Trichosporium* spec.	Auf der Cupula von *Fagus silv.*	Fruktifiziert und wächst ziemlich gut
16. *Hormodendrum cladosporioides* Sac.	Auf toten Pflanzen sehr häufig	Fruktifiziert und wächst sehr gut
17. *Bispora molinioïdes* Corda	Auf Buchenstümpfen sehr häufig	Fruktifiziert sehr gut. Mycel ziemlich groß
18. *Clasterosporium* spec.	Auf Buchenholz	Fruktifiziert und wächst gut
19. *Spondylocladium* spec.	Auf einem Eichenstumpf	Fruktifiziert spärlich. Großes Mycel
20. *Septonema* spec.	Auf Buchenholz	Verlor auf Agar allmählich die Fähigkeit, Conidien zu bilden. Großes Mycel
21. *Helminthosporium* sp. *(obclavatum?)*	Auf Buchenholz	Fruktifiziert spärlich. Mycel groß
22. *Acrothecium tenebrosum* Preuß.	Auf faulem Holz. Häufig	Mycel groß. Fruktifiziert spärlich
23. *Dendryphium fumosum* Corda	Auf Baumstümpfen. Ziemlich häufig	Fruktifiziert schwach. Mycel groß
24. *Dendryphium toruloides* Fresen.	Auf dürren Stengeln	Fruktifiziert schwach. Mycel groß
25. *Sporoschisma nova* spec.	Auf faulem Holz von *Picea*	Fruktifiziert und wächst ziemlich gut
26. *Dictyosporium elegans* Corda	Auf morschem Ahornholz	Steril. Mycel stark
27. *Macrosporium commune* Rbh.	Auf toten Pflanzenteilen. Häufig	Fruktifiziert und wächst sehr gut
28. *Alternaria tenuis* Nees.	Auf toten Pflanzenteilen sehr häufig	Fruktifiziert und wächst sehr gut
29. *Triposporium* spec.	Auf Buchenholz	Steril. Mycel groß
30. *Ceratocladium microspermum* Corda	Auf Buchenholz und auf Rinde von *Crataegus*	Wächst und fruktifiziert gut
31. *Graphium penicillioides* var. *Ungeri* Sacc.	Auf Holz von *Picea exc.* Häufig	Fruktifiziert sehr gut. Mycel zart
32. *Stysanus Echinobotryum*[1])	Auf dürren Ästen von *Sorbus aucup.*	Fruktifiziert und wächst gut
33. *Sporocybe* spec.	Auf morschem Buchenholz	Fruktif. u. wächst zieml. gut
34. *Tubercularia vulgaris* Tode	Auf dürren Ästen. Häufig	Fruktifiziert und wächst ziemlich gut

1) Da ich sowohl aus den „*Stysanus*“- als auch aus den „*Echinobotryum*“-Conidien im Gegensatz zu Guéguen (04, S. 217) immer nur *Echinobotryum*- und *Stysanus*-Conidien zusammen erhielt, so habe ich vorläufig die Bezeichnung *Stysanus Echinobotryum* gewählt.

Spezies	Fundort und Häufigkeit des Vorkommens	Wachstum auf Agar ohne Zugabe von gebundenem Stickstoff
35. *Fusarium* spec. *(Selenosporium* Corda)	Auf Holz von *Betula*	Fruktifiziert und wächst gut
36. *Epicoccum purpurascens* Ehrenb.	Auf dürren Blättern ziemlich häufig	Steril. Starkes Mycel
37. *Monochaetia alnea* Hariot el Briard	Auf Buchenrinde	Fruktifiziert und wächst gut
38. *Phoma complanata* Tode	Auf dürren *Angelica*-Stengeln	Fruktifiziert und wächst gut
39. *Phoma mellaena* Mont. et Dur.	Auf dürren Stengeln von *Astragalus*	Fruktifiziert und wächst gut
40. *Phoma* spec.	Auf Buchenrinde	Fruktifiziert und wächst gut
41. *Vermicularia* spec.	Auf Umbelliferen-Stengeln. Häufig	Steril. Großes Mycel
42. *Bulgaria inquinans* Fries	Auf Buchenholz	Steril. Großes Mycel
43. *Hysterium Fraxini* Pers.	Auf dürren *Fraxinus*-Asten	Steril. Großes Mycel
44. *Aspergillus niger* Van Tieghem	—	Fruktifiziert und wächst gut
45. *Penicillium glaucum* Link.	—	Fruktifiziert und wächst gut
46. *Chaetomium bostrychodes* Zopf	Auf Samenschalen von *Helianthus annuus*	Fruktifiziert und wächst gut
47. *Nectria ditissima* Tul.	Auf Laubbäumen. Häufig	Wächst und fruktifiziert gut
48. *Melanomma* spec.	Auf Umbelliferen-Stengeln	Steril. Großes Mycel
49. *Pleospora microspora* Nießl.	Auf dürren Schilfblättern. Häufig	Zahlreiche Fruchtkörperanfänge. Großes Mycel
50. *Valsa Eutypa* Achar.	Auf toten Ästen von *Acer*. Häufig	Steril. Großes Mycel
51. *Xylaria Hypoxylon* L.	Auf Baumstümpfen. Häufig	Fruktifiziert selten und abnormal. Großes Mycel
52. *Xylaria carpophila* Pers.	Auf der Cupula von *Fagus silv.*	Steril. Mycel ziemlich groß
53. *Cryptospora* spec.	Auf morschem Holz	Steril. Mycel ziemlich groß
54. *Mucor stolonifer* Ehrenb.	—	Fruktifiziert und wächst gut

Die Reinkulturen wurden in Reagenzgläschen auf schräg-erstarrtem Agar aufbewahrt und jährlich 2—3 mal auf frisches Substrat übergeimpft.

Ob alle Pilze, die auf diesem Substrat gut wachsen, den ungebundenen Stickstoff assimilieren, wurde nicht untersucht. Es ist

aber zu beachten, daß z. B. *Stachybotrys lobulata* auf unserm Agar ebenso gut wuchs, wie etwa *Hormodendrum*. Auf den sehr stickstoffarmen Kieselsäure-Platten aber wuchs *Stachybotrys* fast gar nicht mehr, während sich *Hormodendrum* noch leidlich gut entwickelte. Doch ist es nicht unmöglich, daß *Stachybotrys* mit einer geringen Menge Anfangs-N, also auf unserm Agar, den elementaren Stickstoff assimiliert, wie das für *Hormodendrum* und andere nachgewiesen wurde, nur daß *Stachybotrys* vielleicht etwas mehr Anfangs-N braucht, um assimilieren zu können.

Dies ist nur ein prägnantes Beispiel, doch lassen sich beim Vergleichen der Tabellen der Agarkulturen mit den späteren Kulturen auf Kieselsäuregel noch zahlreiche entsprechende Fälle auffinden. Die fünf Formen, die auf der Kieselsäuregallerte relativ gut wuchsen, treten hier auf dem Agar noch nicht hervor. Die drei Gruppen, in die wir die Pilze später nach dem Wachstum auf sehr stickstoffarmem Substrat einteilen, finden wir hier noch nicht angedeutet.

II. Kultur auf Kieselsäuregallerte ohne gebundenen Stickstoff.

1. Darstellung der Kieselsäure.

Da trotz der Vorschriften von Winogradsky (91, S. 92—100) und Omeljansky (99, S. 537) die Herstellung einer tadellosen Gallerte nicht immer gelingen will, so beschäftigte ich mich längere Zeit eingehend damit. Außer den beiden obigen Autoren haben sich in neuerer Zeit Beijerink (04, S. 28) und Stevens und Temple (08, S. 87) mit ihrer Darstellung beschäftigt.

Beijerink hat einfach die Wasserglaslösung des Handels verdünnt und mit Salzsäure titriert. Es entsteht dann schon in ganz kurzer Zeit eine Gallerte, die in strömendem Wasser von Kochsalz befreit wird. Hierauf wird diese in eine Nährlösung gebracht, bis die Gallerte damit vollgesogen ist; dann ist der Nährboden fertig. Daß das nur ein ungenügender Ersatz für die Winogradskysche Methode ist und nur deshalb einen Wert für die Praxis hat, weil dadurch der Dialysierprozeß umgangen wird, ist klar.

Auch die Methode von Stevens und Temple umgeht die Dialyse. Eine Wasserglaslösung, die 4—5% Kieselsäure enthält, wird mit Salzsäure neutralisiert und dann ganz schwach angesäuert. In diesem Zustand kann die Mischung im Autoklaven sterilisiert werden ohne zu gerinnen. Will man eine Gallerte erzeugen, so

wird die Mischung einfach mit Natriumkarbonat schwach alkalisch gemacht, worauf sie in kurzer Zeit gerinnt. Das Kochsalz, das dabei entsteht, bleibt in der Gallerte. Ob die 12—20% Kochsalz wirklich ganz ohne Einwirkung auf die darauf kultivierten Salpeterbakterien war, wie die beiden Autoren versichern, wäre noch zu untersuchen.

Der springende Punkt bei der Darstellung der Kieselsäure ist die Dialyse.

Ich hoffe durch eine genaue Beschreibung des Verfahrens manchem die Darstellung der Kieselsäure zu erleichtern.

1 Teil Natriumwasserglaslösung[1]) vom spez. Gew. 1,09—1,10 (Omeljansky verwendete eine Lösung vom spez. Gew. 1,05—1,06) und 1 Teil Salzsäure vom spez. Gew. 1,10 werden gemischt, indem man die Wasserglaslösung in die Salzsäure gießt (nicht umgekehrt!). Hiermit werden Pergamentschläuche[2]) gefüllt, die 50 mm breit und ca. 35 cm lang sind. Vor Gebrauch werden sie aufs sorgfältigste auf ihre Dichtigkeit geprüft, indem sie, einerseits mit einer Schraubenklemme geschlossen, mit destill. Wasser gefüllt frei aufgehängt werden. Nur diejenigen Schläuche, die gar kein Wasser durchsickern lassen und während eines Tages nur relativ wenig Wasser durch Verdunsten verlieren, sind brauchbar.

Mit der Mischung (Salzsäure + Natriumwasserglas) werden die Schläuche nur bis zu $^1/_3$ ihres Fassungsvermögens gefüllt. Hierauf wird das andere Schlauchende ebenfalls mit einer Schraubenklemme geschlossen, indem man durch Zusammendrücken des Schlauches dafür sorgt, daß möglichst alle Luft aus dem Schlauch entfernt wird. Je weniger ein Schlauch gefüllt ist, desto schneller ist die Dialyse beendigt.

Die so gefüllten Schläuche werden in einer großen Kuvette dialysiert. Sie liegen horizontal auf einem Gestell von Holzstäben, das mehrere Etagen hat. So ist jeder Schlauch allseitig von Wasser umspült und zugleich die dialysierende Oberfläche wegen der geringeren Deformation bedeutend besser ausgenützt, als wenn die Schläuche vertikal aufgehängt sind.

12 Stunden wird gegen schnellfließendes Brunnenwasser (ca. 4 l pro Min.) dialysiert. Das Wasser kommt von unten her, strömt zwischen den Säcken durch und fließt oben ab.

---

1) Das Na_2SiO_3 + aqu. wurde als Natr. silic. pur. cryst. von E. Merk in Darmstadt bezogen.

2) Die Pergamentschläuche wurden von der Firma C. Desaga in Heidelberg bezogen.

Die Temperatur soll etwa 15° C betragen. Im Winter mußte deshalb das Wasser zuerst durch einen „Wärmeerzeuger“ geleitet werden. Weitere 12 Stunden wird die Dialyse gegen 2 – 3 mal erneuertes destill. Wasser fortgesetzt. Im dest. Wasser konnte natürlich das Holzgestell nicht verwendet werden. Die Schläuche lagen hier entweder in flachen Schalen nebeneinander oder hängen vertikal in der großen Kuvette.

Sind die Schläuche mit 100 ccm obiger Mischung gefüllt, so enthält das erhaltene Hydrosol etwa 0,01% Kochsalz. Letzteres beeinflußt die Haltbarkeit der Lösung nicht und entspricht gerade dem Kochsalzgehalt der Winogradskyschen Nährlösung. In der Nährlösung wurde deshalb das Kochsalz weggelassen. Enthielten die Schläuche 200 ccm Lösung, so fand sich im resultierenden Hydrosol ca. 0,05% Kochsalz. Je länger die Dialyse fortgesetzt wird, umsoweniger Kochsalz findet sich im Hydrosol, umsomehr nimmt aber auch dessen Beständigkeit ab (vgl. Gmelin-Krauts Handbuch der anorg. Chemie 1908, Bd. III, Abt. 1, S. 149).

Wünscht man einen geringeren Kochsalzgehalt als 0,01%, so wird man nicht die Zeit der Dialyse verlängern, sondern die Menge der Flüssigkeit pro Schlauch verringern. Ganz kochsalzfrei wird man auch nach wochenlangem Dialysieren die Kieselsäure nicht erhalten können.

Während des Dialysierens verdünnen sich die Lösungen in den Schläuchen durch osmotische Wasseraufnahme. Werden die Schläuche mit 100 ccm gefüllt, so ist am Ende der Dialyse 142 ccm Hydrosol vorhanden, werden sie mit 200 ccm gefüllt, so resultieren 280 ccm Hydrosol. Mit dem Kochsalz permeïert auch etwas Kieselsäure in das umgebende Wasser.

Das Hydrosol hat das spez. Gew. 1,012 (bei Verwendung einer Natriumwasserglaslösung vom spez. Gew. 1,099) und enthält auf 100 Teile Lösung 1,6 Teile Kieselsäure. Die Kieselsäurelösung zeigt in dicken Schichten eine kaum bemerkbare Opaleszenz, sie ist schwach sauer und läßt sich bis zu einem Jahr aufbewahren, ohne zu koagulieren oder die gallertbildenden Eigenschaften einzubüßen. Die Lösung kann im Autoklaven bei 135° C und 2 Atmosphären Überdruck ohne zu koagulieren sterilisiert werden.

18 ccm dieser Kieselsäurelösung werden mit 2 ccm einer 10fach normalen Nährlösung, ohne Zusatz von Kochsalz, in einem Kölbchen gut gemischt und damit Platten gegossen. Eine solche Mischung

koaguliert selbst nach vielen Tagen nicht und nimmt im Autoklaven bei 135° C sterilisiert nur eine zähflüssige Konsistenz an.

Um eine feste Gallerte zu erhalten, verwendete Omeljansky Magnesiumkarbonat und zwar in solcher Menge, daß die entstehende Gallerte ein „milchiges Aussehen gewann". Da das Magnesiumkarbonat eine ziemlich stark alkalische Reaktion aufweist, so wurde nach einem andern Körper gesucht, der bei neutraler Reaktion und ohne schädlichen Einfluß auf das Pilzwachstum Koagulation hervorruft.

Kalziumkarbonat hatte leider keine Wirkung. Weitere Versuche in dieser Richtung bezweckten, durch Zusätze von Aufschlämmungen, deren Partikelchen suspendiert bleiben, die Gelbildung auszulösen. Das Gerinnen wird nämlich beschleunigt (vgl. Gmelin-Kraut 1908, Bd. III, Abt. 1, S. 148) durch „Graphit und andere indifferente Körper". Von solchen Aufschlämmungen wurden geprüft: feingemahlener Asbest, Asbest und Kalziumkarbonatpulver, Glaspulver, feingemahlener Tabaschir, Aluminiumhydroxyd und Magnesiumoxyd, das letztere wies allerdings eine ziemlich stark alkalische Reaktion auf.

Außer Magnesiumoxyd zeigte nur Asbest mit Kalziumkarbonat eine Koagulation, aber eine sehr unvollkommene. Magnesiumoxyd dagegen bildete selbst in sehr geringen Zusätzen eine schöne und feste Gallerte, die derjenigen von Magnesiumkarbonat in keiner Weise nachstand, leider aber bedeutend alkalischer war. Für unsere Zwecke kann also nur Magnesiumkarbonat und Magnesiumoxyd in Betracht kommen. Magnesiumkarbonat muß wegen der geringeren Alkaleszenz bevorzugt werden.

Durch eine Reihe von Versuchen wurde festgestellt, welches die niedrigste Konzentration von Magnesiumkarbonat sei, die gerade genügt, um eine feste Gallerte zu bilden.

Werden 3 ccm einer 4%igen Aufschlämmung von Magnesiumkarbonat zu 20 ccm Nährlösung + Kieselsäure zugesetzt, so ist die Mischung schon nach 3 Stunden zu einer festen Gallerte erstarrt. Die Erstarrungszeit nimmt mit abnehmender Magnesiumkarbonatkonzentration zu. Bei Anwendung von $^1/_8$ ccm obiger Magnesiumkarbonat-Aufschlämmung war die Erstarrung bei neutraler Reaktion erst nach 2 Tagen vollzogen. Mit $^1/_4$ ccm trat in 1—$1^1/_2$ Tagen Gelbildung ein. Diese Gallerte reagierte schwach alkalisch. Bei Zusatz von $^1/_{10}$ ccm der 4% Magnesiumkarbonat-Aufschlämmung war selbst nach 4 Tagen keine Spur einer Gelbildung zu beobachten,

im Autoklaven dagegen trat eine schwache und unvollkommene Gerinnung ein.

Für unsere Zwecke am passendsten ist ein Zusatz von $^1/_4$ ccm unserer Aufschlämmung, zumal die feine Trübung der Gallerte verschwindet, indem das Magnesiumkarbonat mit der Kieselsäure wahrscheinlich eine Verbindung eingeht. Die so erhaltenen Platten sind vollkommen klar. Sie müssen bei 90—95° C pasteurisiert werden und sind dann impfbereit.

Sollen die Platten innerlich beimpft werden, so muß man in getrennten Kölbchen:

1. die Kieselsäurelösung,
2. die Nährlösung (10fach normal),
3. die Magnesiumkarbonat-Aufschlämmung

sterilisieren. Nach Mischung der 3 Lösungen wird geimpft, worauf in bekannter Weise Platten gegossen werden. Man braucht aber in diesem Fall erheblich mehr Magnesiumkarbonat, um eine feste Gallerte zu erhalten. Die fertige Platte zeigt in diesem Fall ein „milchiges" Aussehen.

Legt man Wert auf neutrale Reaktion und Durchsichtigkeit, so wird, wie oben beschrieben, verfahren und man kann, wie es Winogradsky und Omeliansky taten, mit einem schwach gekrümmten Glasstab den geimpften Tropfen breitstreichen und so eine genügende Verteilung der Keime erzielen.

Solche Petrischalen konnten 2—3 Monate im Kulturkasten stehen ohne Risse zu zeigen.

2. Wachstum der Pilze auf den Kieselsäure-Platten ohne Zugabe von Stickstoffverbindungen.

Mit Recht wird man wohl bei Pilzen, die ein relativ gutes Wachstum auf sehr stickstoffarmem Substrat zeigen, vermuten dürfen, später durch die Analyse eine Stickstoffbindung nachweisen zu können.

Viele Autoren, so Koch (03, S. 182), Czapek (02, S. 557) und andere haben dieser Untersuchungsweise jede Berechtigung abgesprochen, indem sie darauf hinweisen, daß manche Pilze mit den vorhandenen Stickstoffverbindungen außerordentlich sparsam umzugehen wissen. Meine späteren Analysen bestätigten aber die Richtigkeit meiner Voraussetzungen für mehrere Pilze.

Die mikroskopische Untersuchung des Mycels gibt für die Beurteilung wichtige Anhaltspunkte. Wenn Aso (zitiert nach Czapek S. 80) für die Conidien von *Aspergillus oryzae* einen Stickstoffgehalt von 6,38% angibt und Ternetz (07, S. 386) für ein steriles Mycel von *Phoma radicis Ericae* einen solchen von 0,41%, so zeigt das deutlich, wieviel höher man ein fruktifizierendes gegenüber einem sterilen Mycel zu taxieren hat.

In dieser Beziehung ganz besonders interessant sind folgende Angaben von Ternetz (07, S. 385). Es zeigte z. B. *Phoma radicis Vaccinii*, deren Mycel 21 mg wog, einen Stickstoffgewinn von 15,65 mg. Der Pilz hatte reichlich Pykniden gebildet. Ein Mycel von *Phoma radicis Ericae*, das zu gleicher Zeit und unter den gleichen Bedingungen kultiviert wurde, aber nicht fruktifizierte, wog 324,6 mg und wies einen Stickstoffgewinn von nur 2,32 mg auf. Das Mycel von *Phoma radicis Ericae*, das 15mal schwerer als das von *Phoma radicis Vaccinii* war, band also 7mal weniger Stickstoff. Es entspräche bei gleicher Stickstoffbindung dem fruktifizierenden Mycel ein nicht fruktifizierendes mit 105mal schwererem und wohl auch annähernd ebensovielmal größerem Mycel. Die letzten Zahlen zeigen ganz evident, welch bedeutend höheren Wert man einem fruktifizierenden Mycel gegenüber einem sterilen zuzuschreiben hat.

Es gibt aber auch Pilze, deren Conidien auf sehr stickstoffarmem Substrat mit Öl vollgestopft sind. Für solche können natürlich die obigen Betrachtungen kaum gelten.

Die Petrischalen mit der Kieselsäuregallerte wurden möglichst genau in die Mitte geimpft, damit sich das Mycel nach allen Seiten gleichmäßig ausdehnen konnte.

Wuchs der Pilz in den Reinkulturen steril, so mußte eine minimale Spur des Mycels übergeimpft werden. In den übrigen Fällen wurden dazu natülich nur ganz wenige Conidien verwendet. Wie gering der dadurch eingeführte Stickstoff ist, das zeigen die Berechnungen Froehlichs (08, S. 279), wonach 150 Millionen *Hormodendrum*-Conidien nur 1 mg Stickstoff enthalten würden. Daß die größere Menge von sterilem Impfmaterial kaum mehr Stickstoff enthält, das zeigen zur Genüge die oben gemachten Überlegungen für ein steriles und ein fruktifizierendes *Phoma*-Mycel.

Die Kieselsäureplatten und auch später die Kulturen, die zu den Stickstoffanalysen dienten, waren in einem Kasten aus Zinkblech aufgestellt. Dieser Kasten ist in Froehlichs Arbeit (08, S. 265) abgebildet. Außer den U-Röhren dienten im Kasten selbst

mehrere Schalen mit Säure und Lauge zur Absorption der Stickstoffverbindungen der Luft.

Der Kasten stand in dem schon erwähnten Zimmer, dessen Luft durch Schalen mit Säure und Lauge nach Möglichkeit von gasförmigen Stickstoffverbindungen gereinigt wurde.

Daß die Kieselsäure als soche nicht ungünstig auf das Pilzwachstum einwirkt, das zeigten nicht nur Kulturen auf stickstoffhaltigen Kieselsäureplatten, sondern auch solche auf flüssigen Nährlösungen. Wurde auf das sehr spärliche Mycel einer Kultur auf Kieselsäuregel mit der reinen Dextrose sterilisiertes Pepton oder Asparagin gestreut, so wuchs das Mycel an der betreffenden Stelle plötzlich sehr üppig heran und fruktifizierte z. B. bei *Penicillium* und *Aspergillus* nach $1^1/_2$ Tagen schon außerordentlich reichlich.

Bei der folgenden Kulturserie wurden 52 Pilze verwendet. Neben Kulturen mit 4% Dextrose wurde eine parallele Reihe mit Saccharose in äquimolekularer Konzentration verwendet. Wenn das Wachstum auf Saccharose meist etwas geringer war, als auf Dextrose, so ist das sehr wahrscheinlich der größeren Reinheit der Saccharose zuzuschreiben. Berücksichtigen wir nur den N-Gehalt der Dextrose purissimum, so enthielte dieser Nährboden noch 0,0001% N. Der N-Gehalt der Kieselsäure wurde nicht bestimmt, doch dürfen wir annehmen, daß derselbe noch bedeutend niedriger ist, als der oben angegebene Wert für Dextrose purissimum.

Das ausführliche Protokoll der mehr als 100 Kulturen hier wiederzugeben, hätte keinen Wert. Die Pilze lassen sich nach ihrem Wachstum am besten in 3 Gruppen einreihen.

1. Kaum wachsend, ganz steril, sehr viel Öl.

1. *Trichoderma lignorum* Tode.
2. *Penicillium roseum* Link.
3. *Monopodium uredopsis* Delacr.
4. *Acrostalagmus cinnabarinus* Corda.
5. *Torula* spec.
6. *Stachybotrys lobulata* Berk.
7. *Periconia pycnospora* Fresen.
8. *Clasterosporium* spec.
9. *Helminthosporium* spec.
10. *Dendryphium toruloides* Fresen.
11. *Dendryphium fumosum* Corda.
12. *Dictyosporium elegans* Corda.
13. *Triposporium* spec.
14. *Ceratocladium microspermum* Corda.
15. *Sporocybe* spec.
16. *Vermicularia* spec.
17. *Hysterium Fraxini* Pers.
18. *Phoma* spec.
19. *Bulgaria polymorpha* van Tieghem.
20. *Chactomium bostrychodes* Zopf.
21. *Valsa Eutypa* Achar.
22. *Xylaria Hypoxylon* L.
23. *Xylaria carpophila* Pers.
24. *Cryptospora* spec.
25. *Barya* spec.

2. Etwas besser wachsend, steril oder wenige Anfänge von Fruktifikation, viel Öl.

1. *Chromosporium* spec.
2. *Verticillium* spec.
3. *Botrytis cinerea* Pers.
4. *Monotospora* spec.
5. *Coniosporium* spec.
6. *Hormiscium stilbosporum* Corda.
7. *Acrothecium tenebrosum* Preuss.
8. *Spondylocladium* spec.
9. *Sporoschisma nova* spec.
10. *Tuberculatia vulgaris* Tode.
11. *Fusarium roseum* Link.
12. *Epicoccum purpurascens* Ehrenberg.
13. *Monochaetia alnea* Hariot et Briard.
14. *Phoma mellaena* Mont et Dur.
15. *Phoma complanata* Tode.
16. *Aspergillus niger* van Tiegh.
17. *Penicillium glaucum* Link.
18. *Nectria ditissima* Tul.
19. *Melanomma* spec.
20. *Pleospora microspora* Niessl.
21. *Mucor stolonifer* Ehrenberg.
22. *Stysanus Echinobotryum.*

3. Relativ gut wachsend und zum Teil sehr gut fruktifizierend, wenig Öl.

1. *Hormodendrum cladosporioides* Sacc.
2. *Bispora molinioides* Corda.
3. *Macrosporium commune* Rbh.
4. *Alternaria tenuis* Nees.
5. *Graphium penicillioides var. Ungeri* Sacc.

Im großen und ganzen zeigen die Kulturen mit wenigen Ausnahmen ein sehr spärliches Gedeihen. Besonders auffällig ist das bei Pilzen, die auf dem Agar ohne Stickstoffzusatz sehr gut wuchsen und fruktifizierten. Häufig z. B. bei *Hormiscium* ist das Mycel in Gemmen zerfallen, da die dazwischenliegenden Partien abgestorben sind.

Sehr anschaulich wird uns dieser Hungerzustand z. B. bei *Chromosporium* und *Pleospora microspora* vor Augen geführt. Nachdem das Mycel eine gewisse Größe erreicht hat, wachsen einige Zellen zu feinen Hyphen aus, die ungefähr nur ein $^1/_4$ der Dicke der normalen haben. Diese feinen Hyphen wachsen nicht ins Substrat hinein, sondern dringen von den Scheidewänden aus in die benachbarten Zellen ein. So wird oft von einer Zelle aus die ganze primäre Hyphe von feinen Fäden durchwuchert, die sich in vielen Windungen zwischen den massenhaften Öltropfen hindurchwinden.

Bei andern z. B. bei *Periconia pycnospora* wachsen die gemmenartigen Zellen zu sehr feinen Hyphen aus, die in das umgebende Nährsubstrat eindringen, um bald ihr Wachstum einzustellen.

Fettes Öl fand sich überall und fast durchweg in großen Mengen, so daß oft beinahe der ganze Inhalt der Hyphen aus lauter dicht aneinander schließenden Öltropfen bestand. Daß diese Kugeln

wirklich fettes Öl waren, zeigten einige Reaktionen. Die Reagenzien müssen aber ziemlich lange einwirken, da die oft recht dicken Wände das Eindringen der Lösungs- und Färbemittel stark verzögern. In den getrockneten Hyphen war das Öl erst nach $1^1/_2$—2 Tagen gelöst. Auch die Färbungen verlangten ziemlich lange Einwirkungszeit. Einzig bei Anwendung von Osmiumsäure trat sofort oder sehr bald Dunkelfärbung ein.

Diese mit fettem Öl vollgestopften, gar nicht oder nur spärlich fruktifizierenden Mycelien sind zweifellos krankhafte Zustände. Daß diese kümmerlichen Mycelien durch Stickstoffhunger bedingt sind, wurde durch einige Kulturserien erwiesen, über die ich am Ende dieses Kapitels kurz referieren werde.

Auch Gerlach und Vogel (04, S. 642) erwähnen von einem unbestimmten Pilz, den sie auf sehr stickstoffarmem Substrat kultivierten, daß die Pilzmassen überaus reich an Fett seien. Ebenso zeigten die von Claudio Fermi kultivierten Schimmelpilze auf seinen „stickstofffreien“ Substraten reichlich „Vakuolen“, die bei Zusatz von Ammoniumverbindungen verschwanden. Wir dürfen diese Vakuolen wohl als Öltropfen ansehen.

Für Diatomeen hat Beijerink (04, S. 28) festgestellt, daß jede Ursache, die das Wachstum hemmt, zur Ölbildung Anlaß gebe. Diatomeenkulturen mit Ammoniumchlorid zeigten kein Öl, während letzteres ohne die Stickstoffverbindung sofort massenhaft angehäuft wurde. Dies entspricht ganz meinen Befunden bei Pilzen.

Nur bei etwa 5 Pilzen, für die ich später Stickstoffbindung feststellte, konnte ein einigermaßen gutes Wachstum konstatiert werden.

Auch für 5 Pilze aus der zweiten Gruppe, die auf Kieselsäure schon bedeutend schlechter wuchsen, konnte, wie wir später sehen werden, Bindung des elementaren Stickstoffs nachgewiesen werden.

Ob die Pilze der ersten Gruppe, die auf der Kieselsäure kaum wuchsen, bei einem geringeren Anfangsstickstoffgehalt den elementaren Stickstoff assimilieren, kann nur durch Analysen erwiesen werden, solche liegen aber für keinen der Pilze aus dieser Gruppe vor. Nur das kann als sicher gelten, daß diese ohne gebundenen Stickstoff nicht assimilieren.

Mit der gleichen Nährlösung, wie ich sie für die Kieselsäureplatten verwendete, wurden auch Flüssigkeitskulturen in kleinen Erlenmeyerkölbchen mit ca. 30 ccm Nährlösung und etwas Kalziumkarbonat angesetzt. Die Kulturergebnisse waren ungefähr die

gleichen, wie die der Kieselsäureplatten. Die Pilze wuchsen hier meist sogar noch etwas schlechter. Dies trat besonders deutlich bei dem, auf den Kieselsäureplatten sehr gut fruktifizierenden *Graphium* hervor. In der flüssigen Nährlösung war das Wachstum ganz gehemmt. *Bispora* dagegen fruktifizierte auf festem und flüssigem Substrat gleich gut, obwohl es in letzterem ganz submers wuchs.

Daß die Dextrosekonzentration bei Abwesenheit von N-Verbindungen kaum das Wachstum beeinflußt, konnte durch Kulturen mit 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4 und 10% Dextrose erwiesen werden. Im Wachstum war zwischen 0,1% und 10% kein Unterschied zu sehen. Bei 2—3% ließ sich für *Hormiscium* und *Hormodendrum* mit Mühe ein sehr undeutliches Optimum feststellen.

III. Quantitative Analysen von Kulturen mit stickstofffreier und stickstoffhaltiger Nährlösung.

Wenn es auch nach den Resultaten des vorhergehenden Kapitels wahrscheinlich ist, daß mehrere Pilze der zweiten, besonders aber solche der dritten Gruppe den elementaren Stickstoff binden, so ist das doch nur mit Hilfe der Analyse sicher zu beweisen.

Außer dem Nachweis der Stickstoffbindung, sollten die Analysen vor allem einigen Aufschluß geben über die Abhängigkeit der Stickstoffbindung von der Konzentration der dargebotenen Stickstoffverbindung.

Froehlich (08, S. 276) kultivierte seine Pilze auf einer Nährlösung, die pro 100 ccm 0,96 mg gebundenen Stickstoff enthielt. Auch bei Ternetz hatte die Nährlösung sehr wenig Stickstoff und zwar pro 100 ccm 0,56 mg. Dieser Stickstoff stammt fast ausschließlich aus den Verunreinigungen der Dextrose, die, wie schon erwähnt, nicht unbedeutend sind.

Ternetz (08, S. 392) hat jedoch 2 *Phoma*-Arten auf stickstoffreicherem Substrat kultiviert, das aus einem Dekokt von Rhododendron-Blättern bestand, dem die gewöhnlichen Nährsalze und 7% Dextrose zugefügt waren. Diese Nährlösung enthielt 3,88 mg Stickstoff pro 100 ccm. Die Menge des assimilierten Stickstoffs war unter solchen Bedingungen erheblich geringer, als in den stickstoffärmeren Kulturen.

Ternetz (07, S. 384) hält es für wahrscheinlich, daß es sich bei der Stickstoffassimilation um einen Notbehelf handle: „Wenn kein gebundener Stickstoff vorhanden ist, verstehen sie es, sich auch mit molekularem Stickstoff zu behelfen“. Doch gibt Ternetz (07,

S. 393) zu, daß vielleicht Stickstoffverbindungen in anderer Form eine Steigerung des Wachstums bedingen könnten. Mir scheint es nicht unwahrscheinlich, daß für die geringere Stickstoffassimilation nicht die Stickstoffverbindungen, also wohl vor allem Eiweißstoffe, sondern vielmehr die Sekrete und Gerbstoffe der Rhododendron-Blätter verantwortlich gemacht werden müssen.

Froehlich hat keine Analysen von Kulturen mit mehr als 0,96 mg Anfangsstickstoff pro 100 ccm Nährlösung gemacht. Doch fand er (08, S. 267) auf Agar, dem 0,5% und 1,0% Salpeter beigefügt war, nur eine sehr geringe Steigerung des Wachstums. Meine zahlreichen Versuche zeigen eine sehr bedeutende Steigerung des Trockengewichts bei Zunahme der Stickstoffkonzentration in der Nährlösung.

Wenn ich am Anfang des ersten Kapitels den Stickstoffgehalt des natürlichen Substrates der verwendeten Pilze als einen relativ niedrigen erwähnt habe, so muß er im Verhältnis zu den geringen Mengen, in denen er sich in den Kulturen von Ternetz und Froehlich vorfand, als ein ziemlich hoher bezeichnet werden.

Ich glaube daher, daß es kaum ganz gerechtfertigt ist, aus einem Stickstoffgewinn auf einem Substrat, das nur 0,96 mg Stickstoff pro 100 ccm enthält, auf Stickstoffbindung auch auf dem natürlichen Substrat, also auch Laub usw. schließen zu dürfen. Erst wenn es erwiesen ist, daß auch in Kulturen mit noch höheren Konzentrationen von gebundenem Stickstoff der elementare assimiliert wird, kann mit gewisser Berechtigung auf Stickstoffbindung auch in der Natur geschlossen werden.

M. E. Latham (08, S. 235) hat in neuester Zeit sehr interessante Versuche mit *Aspergillus niger* publiziert. Er fand bei ca. 116 mg Stickstoff pro 50 ccm Nährlösung einen Stickstoffgewinn von 138 mg (Mittel aus 2 Kulturen mit 115,4 und 117,7 mg Stickstoff pro 50 ccm). Als Stickstoffquelle diente Ammoniumnitrat.

Besonders die Versuche Lathams, aber auch solche anderer Forscher, über die ich z. T. später noch kurz referieren werde, munterten dazu auf, Kulturen mit Stickstoffzusatz auszuführen. Es wurde allerdings die Stickstoffverbindung nicht in so hoher Konzentration zugesetzt, wie das Latham tat. Künftige Untersuchungen müssen zeigen, wie sich die hier untersuchten Pilze bei höheren Konzentrationen von N-Verbindungen verhalten.

Zur Analyse wurden Pilzkulturen verwendet, die auf 200 ccm flüssiger Winogradskyscher Nährlösung gewachsen waren. In

jeder Serie wurde je 1 Kolben nicht beimpft und diente zur Bestimmung des Anfangs-N der Kulturen.

Die folgenden Analysen wurden nach der Kjeldahlschen Methode ausgeführt, und zwar im Laboratorium des Basler Kantonschemikers durch dessen langjährigen Adjunkten Herrn Otto Wolf. Es hatte das nicht nur in bezug auf die Genauigkeit der Resultate einen großen Wert, sondern die Bestimmungen wurden so auch von vollkommen unparteiischer Seite her ausgeführt.

Die Kulturen bereitete ich in folgender Weise für die Analysen vor. In einem von gasförmigen Stickstoffverbindungen sorgfältig gereinigten Raum wurden die Mycelien möglichst rasch filtriert und, nachdem sie gründlich ausgewaschen waren, bei 100° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Die Filtrate wurden in Kjeldahlkolben mit je 10 ccm reiner konz. Schwefelsäure, unter Durchsaugen von sorgfältig gereinigter Luft auf dem Wasserbad eingedampft. Das Durchsaugen der Luft konnte übrigens keine Fehler verursachen, da die Kontrollkultur in genau gleicher Weise behandelt wurde. Die eigentliche Analyse wurde, wie schon erwähnt, im Laboratorium des Kantonschemikers ausgeführt.

Eine kurze Übersicht über die Titerbestimmung und die Berechnung von 2 Analysen mögen der Zusammenstellung der Resultate vorausgeschickt werden.

Titerbestimmung.

(Zusammengestellt nach Daten von O. Wolf.)

a) Verhältnis der H_2SO_4- zur NaOH-Lösung:

50 ccm NaOH entsprechen 50,75 ccm H_2SO_4
50 „ „ „ 50,80 „ „
50 „ „ „ 50,80 „ „

Im Durchschnitt entsprechen
50 ccm NaOH 50,78 ccm H_2SO_4.

b) Gehaltsbestimmung der H_2SO_4:

235,1 mg Na_2CO_3 erfordern 70,50 ccm H_2SO_4
250,9 „ „ „ 75,35 „ „

$$\frac{H_2SO_4}{Na_2CO_3} = \frac{49}{53}$$

$$\frac{49}{53} = \frac{X}{235{,}1} \qquad X = 217{,}356$$

$$\frac{49}{53} = \frac{X}{250{,}9} \qquad X = 231{,}964$$

Die H_2SO_4-Lös. enthält pro ccm $\frac{217{,}36}{70{,}50} = 3{,}0831$ mg H_2SO_4

„ „ „ „ „ $\frac{231{,}96}{75{,}35} = 3{,}0785$ mg H_2SO_4

Im Mittel enthält die H_2SO_4-Lösung pro 1 ccm 3,0808 mg H_2SO_4.

c) Wirkungswert der H_2SO_4-Lösung:

$$\frac{H_2SO_4}{2\,N} = \frac{98}{28} \qquad \frac{49}{14} = \frac{3{,}0808}{X}$$

$$X = 0{,}88023 \text{ mg.}$$

1 ccm H_2SO_4 entspricht also 0,88023 mg N.

d) Blinder Versuch:

Vorgelegt 10,25 ccm Säure = 10,25 ccm

Zurücktitriert 9,60 ccm Lauge $= \frac{50{,}00}{50{,}78} = \frac{9{,}6}{X}$; = 9,75 ccm

0,50 ccm.

Die Reagentien besitzen also einen Stickstoffgehalt gleich 0,50 ccm H_2SO_4-Lösung = 0,44 mg N.

Beispiele der Analysenberechnung.

1. *Macrosporium.* Mycel + Filter (ohne Filtrat):

Vorgelegt 10,15 ccm Säure = 10,15 ccm

Zurücktitriert 3,88 ccm Lauge $\frac{50{,}00}{50{,}78} = \frac{3{,}88}{X}$; = 3,94 ccm

6,21 ccm.

Stickstoffgehalt der Reagentien 0,50 ccm

5,71 ccm.

5,71 ccm Säure entsprechen $0{,}88023 \times 5{,}71 = 5{,}0261$ mg N

Mycel + Filter enthalten 5,0261 mg N

Das Filter enthält 0,0506 mg N

Das Mycel enthält also 4,9755 mg N.

2. *Hormodendrum.* Mycel + Filter (ohne Filtrat):

Vorgelegt 10,25 ccm Säure		= 10,25 ccm
Zurücktitriert 0,65 ccm Lauge	$\frac{50{,}00}{50{,}78} = \frac{0{,}65}{X}$; =	0,66 ccm
		9,56 ccm.
Stickstoffgehalt der Reagentien		0,50 ccm
		9,09 ccm.

9,09 ccm Säure entsprechen $0{,}88023 \times 9{,}09 =$ 8,0013 mg N

Mycel + Filter enthalten	8,0013 mg N
Das Filter enthält	0,0506 mg N
Das Mycel enthält also	7,9507 mg N.

1. *Macrosporium commune* Rbh.

Macrosporium bildete in den Flüssigkeitskulturen sowohl mit als auch ohne Zugabe einer Stickstoffverbindung schwimmende Mycelien, die dunkelbraun oder fast schwarz waren. Aus der Flüssigkeit ragten nur die Conidienträger mit den schwarzen Conidien hervor, weshalb die Oberfläche der Nährlösungen wie berußt aussah. Das Mycel war, im Gegensatz zu *Hormodendron* und anderen nicht so verfilzt und nicht gallertig.

Stickstoffgewinn der *Macrosporium*-Kulturen in Erlenmeyerkolben à 200 ccm Nährlösung, mit und ohne Zusatz von Kalisalpeter. Winogradskysche Nährlösung mit 2 % Dextrose (ohne $MnSO_4$).

Anfangs-N [1]	Trockengew. des Mycels	Mycel-N	Fitrat-N	Gesamt-N	N-Gewinn
mg	mg	mg	mg	mg	mg
0 [2]	17,0	0,01	0,22	0,23	**0,23**
0,57 [3]	37,5	0,50	0,62	1,12	**0,55**
0,84 [2]	64,0	0,16	1,01	1,17	**0,33**
1,19 [3]	179,0	0,32	2,16	2,48	**1,29**
4,50 [2]	380,0	4,98	4,23	9,21	**4,71**
4,53 [3]	477,5	2,48	7,96	10,44	**5,91**

1) Die hier angegebenen Werte für die Menge des Anfangs-N entsprechen folgenden Salpeterkonzentrationen:

0,57 mg N = 0,002 %	4,50 mg N = 0,016 %
0,84 mg N = 0,003 %	4,53 mg N = 0,016 %
1,19 mg N = 0,004 %	

In der blinden Kultur ohne N-Zugabe konnte analytisch kein Stickstoff nachgewiesen werden.

2) 16. April bis 30. Mai 1910. Kulturdauer 44 Tage.

3) 7. Juli bis 30. August 1910. Kulturdauer 53 Tage.

Der Stickstoffgewinn nimmt etwa proportional der zugefügten Stickstoffmenge (Kalisalpeter) zu und ist ungefähr gleich dem Anfangs-Stickstoffgehalt der Nährlösung. Wir finden überall etwa doppelt so viel Endstickstoff, als zugefügt wurde.

Von Froehlich (08, S. 277) ist *Macrosporium* ebenfalls auf Stickstoffbindung untersucht worden. Er fand z. B. folgende Werte in Kulturen mit Winogradskyscher Nährlösung, 5 % Dextrose und einer Kulturdauer von 117 Tagen:

Anfangs-N mg	Mycel-N mg	Filtrat-N mg	Gesamt-N mg	N-Gewinn mg
0,96	0,98	2,88	3,86	**2,90**

Es fällt auf, daß bei ähnlichen Anfangs-N-Gehalten Froehlich bedeutend höhere N-Gewinne zu verzeichnen hat. Froehlichs Kulturen enthielten aber 5 % Dextrose, während meine nur 2 % enthielten. Puriewitsch erwähnt, daß bei steigender Zuckerkonzentration bei *Aspergillus* und *Penicillium* die N-Bindung zunimmt. Das gleiche wird auch hier der Fall sein. Daneben mag vielleicht noch die Verschiedenheit der N-Verbindung in Betracht kommen. Der N-Gehalt in Froehlichs Kulturen stammte aus den Verunreinigungen der Dextrose, derjenige in meinen Kulturen aus KNO_3. Mein Wert verhält sich zu demjenigen Froehlichs etwa wie 2 : 5, also wie die Dextrosekonzentrationen.

Vergleichen wir den Stickstoffgehalt des Mycels mit demjenigen des Filtrats, so ist überall, mit nur einer Ausnahme, das Filtrat bedeutend stickstoffreicher, als das Mycel. Es ist das eine Eigentümlichkeit, die wir fast bei allen Stickstoff assimilierenden Pilzen wiederfinden. Ternetz (07, S. 387) schreibt diesen Stickstoffgehalt des Filtrates den Pycnoconidien der kultivierten *Phoma*-Arten zu: „der relativ sehr große Stickstoffreichtum der Nährlösungen rührt davon her, daß die sehr kleinen Pycnosporen das Filter passieren und in die Nährlösung übertreten". Für *Macrosporium* kann dies aber sicher nicht zutreffen, da die großen mehrzelligen Sporen nicht oder nur ausnahmsweise durchs Filter gehen. Es stammt der Stickstoffgehalt von Ausscheidung stickstoffhaltiger Stoffwechselprodukte her, wie schon Froehlich (08, S. 282) und besonders Latham (08, S. 232) für *Aspergillus niger* angeben. Daß der N-Gehalt des Substrates nicht etwa zum Teil noch aus unverbrauchtem Salpeter-Stickstoff besteht, konnte an Parallelkulturen

gezeigt werden. Mit Diphenylamin und Brucin konnte nicht die geringste Spur von Salpetersäure nachgewiesen werden.

2. *Hormodendrum cladosporioides* Sacc.

Hormodendrum bildet dunkelolivgrüne bis schwarzgrüne, schwimmende Mycelien. Besonders bei Stickstoffzusatz entwickelte sich das Mycel sehr reichlich, so daß auf der Oberfläche der Kulturen ein dichter Pelz von Hyphen entstand, der durch Vergallertung sehr zähe und fest wurde und oft eine Dicke bis zu 1 cm aufwies. Die Conidienträger mit den Conidien bildeten auf der Oberfläche einen olivgrünen, pulvrigen Überzug, der bei älteren Kulturen etwas heller wurde.

Stickstoffgewinn der *Hormodendrum*-Kulturen in Erlenmeyerkolben à 200 ccm Nährlösung mit und ohne Zusatz von Kalisalpeter. Winogradskysche Nährlösung mit 2 % Dextrose (ohne MSO_4).

Anfangs-N mg	Mycel-Gew. mg	Mycel-N mg	Filtrat-N mg	Gesamt-N mg	N-Gewinn mg
0 [1]	63,6	0,32	0,04	0,36	**0,36**
0,82 [1]	130,2	0,77	1,14	1,91	**1,09**
4,50 [1]	735,2	1,55	7,95	9,50	**5,00**
4,53 [2]	1028,0	0,20	8,83	9,03	**4,50**

Auch hier nimmt der Stickstoffgewinn ungefähr proportional dem Anfangsstickstoffgehalt zu und ist der Menge nach etwa gleich letzterem. Wir finden also auch hier den Gesamtstickstoff etwa doppelt so groß als den Anfangsstickstoff.

Hormodendrum wurde schon früher auf Stickstoffbindung untersucht, nämlich von Frank (93, S. 139) und Froehlich (08, S. 277).

Frank fand in einer Nährlösung mit Rohrzucker nach einer Kulturzeit von 300 Tagen einen Stickstoffgewinn von 3,50 mg Da Frank aber keine Kontrollkultur gemacht hat, so ist seine Angabe von sehr geringem Wert.

Froehlich fand für *Hormodendrum* z. B.

Anfangs-N mg	Mycel-N mg	Filtrat-N mg	Gesamt-N mg	N-Gewinn mg
0,96	1,25	2,88	4,13	**3,17**

1) 16. April bis 30. Mai 1910. Kulturdauer 44 Tage.
2) 7. Juli bis 30. Aug. 1910. Kulturdauer 53 Tage.

Hormodendrum verhält sich also ganz ähnlich wie *Macrosporium*. Wir müssen auch hier den bedeutend höheren prozentualen Stickstoffgewinn der höheren Dextrosekonzentration der Froehlichschen Kulturen zuschreiben.

Das Filtrat enthält auch hier überall, außer bei der Kultur ohne Anfangsstickstoff, mehr, oft bedeutend mehr Stickstoff als das Mycel.

3. *Alternaria tenuis* Nees.

Die Mycelien von *Alternaria* schwammen an der Oberfläche der Nährlösung. Sie waren braun und wurden bei älteren Kulturen nur wenig dunkler. *Alternaria* bildet reichlich Luftmycel. Zwischen diesen hellbraunen Lufthyphen werden die Conidien in langen Ketten abgeschnürt. Dieses krause Luftmycel ist für *Alternaria* sehr typisch. Im übrigen verhält sie sich ganz ähnlich wie *Macrosporium*.

Stickstoffgewinn der *Alternaria*-Kulturen in Erlenmeyerkolben à 200 ccm Nährlösung mit Zusatz von Kalisalpeter. Winogradskysche Nährlösung mit 2 % Dextrose (ohne $MnSO_4$).

Anfangs-N mg	Trockengew. des Mycels mg	Mycel-N mg	Filtrat-N mg	Gesamt-N mg	N-Gewinn mg
1,19 [1]	212,5	0,32	1,89	2,21	1,02
4,53 [1]	2039,0	0,64	9,44	10,08	5,55

Diese Resultate für *Alternaria* entsprechen ganz denjenigen von *Macrosporium* und *Hormodendrum*.

Für *Alternaria* liegen schon von Berthelot und Froehlich Angaben über Stickstoffbindung vor.

Berthelot (93, S. 847) fand in einer Kultur mit Saccharose und Ammoniumtartrat als Stickstoffverbindung bei einem Anfangsstickstoffgehalt von 16,4 mg einen Stickstoffgewinn von 8,85 mg, also nur etwa die Hälfte des zugegebenen.

Froehlich (08, S. 274) fand für *Alternaria* bei einer Kulturdauer von 212 Tagen folgende Werte:

1) 7. Juli bis 30. Aug. 1910. Kulturdauer 53 Tage.

Anfangs-N mg	Mycel-N mg	Filtrat-N mg	Gesamt-N mg	N-Gewinn mg
0,96	0,43	4,84	5,27	**4,31**

Auch diese Zahlen entsprechen ganz denjenigen von *Hormodendrum* und *Macrosporium*. Besonders deutlich tritt hier der Unterschied zwischen Mycel- und Filtrat-Stickstoffgehalt hervor.

4. *Bispora molinioides* Corda.

Bispora wuchs im Gegensatz zu *Macrosporium*, *Alternaria* und *Hormodendrum* fast durchweg submers auf dem Boden des Kulturkolbens. Die halbkugeligen, tiefschwarzen Rasen bestanden, besonders bei den Kulturen ohne Stickstoffzusatz, fast nur aus dichtgedrängten Conidienketten.

Nur ganz vereinzelt schwammen einige kleine Rasen, die sehr gut fruktifizierten, an der Oberfläche der Nährlösung.

Stickstoffgewinn der *Bispora*-Kulturen in Erlenmeyerkolben à 200 ccm Nährlösung mit und ohne Zusatz von Kalisalpeter. Winogradskysche Nährlösung mit 2 % Dextrose (ohne $MnSO_4$).

Anfangs-N mg	Trockengew. des Mycels mg	Mycel-N mg	Filtrat-N mg	Gesamt-N mg	N-Gewinn mg
0 [2])	15,0	0,45	0,16	0,61	**0,61**
0,82 [1])	72,5	0,90	0,23	1,13	**0,31**
4,50 [1])	136,0	2,94	3,00	5,94	**1,44**

Der Stickstoffgewinn ist bei *Bispora* bedeutend geringer als bei den drei vorher erwähnten Pilzen. Auch hier ist der absolute Stickstoffgewinn bei 4,50 mg Anfangsstickstoff bedeutend größer als bei 0,82 mg oder bei den „stickstofffreien" Kulturen.

Der Stickstoffgewinn ist bei *Bispora* nicht, wie bei den drei vorhergehenden Pilzen ca. 100 %, sondern nur etwa 35 % des Anfangsstickstoffs. Der relativ hohe Wert der Kultur ohne Stickstoffzusatz mag wohl, zum Teil wenigstens, darauf beruhen, daß diese zu anderer Zeit und etwas länger kultiviert worden ist.

1) 16. April bis 30. Mai 1910. Kulturdauer 44 Tage.
2) 7. Juli bis 30. Aug. 1910. Kulturdauer 53 Tage.

Bei *Bispora* ist im Gegensatz zu den drei vorhergehenden Pilzen der Stickstoffgehalt des Filtrates meist erheblich kleiner als der des Mycels resp. der Conidien, da der Pilz fast nur aus solchen besteht. Daraus erklärt sich auch der hohe Stickstoffgehalt des „Mycels".

Bispora ist früher noch nie auf Stickstoffassimilation untersucht worden.

5. *Botrytis cinerea* Pers., *Melanomma* spec., *Epicoccum purpurascens* Ehrenberg.

Die schwimmenden großen Mycelien von *Botrytis* waren stark gallertig. Die Farbe war ein schmutziges Weiß. Auf der Oberfläche wurden ziemlich reichlich Conidien gebildet, die in älteren Kulturen einen grauen Farbenton zeigten. Ringsherum an den Glaswänden wurden reichlich Sclerotien angelegt, die allerdings nicht sehr groß wurden. Sie breiteten sich flach, fingerförmig, bis 1 cm über der Flüssigkeit, an den Glaswänden des Kolbens aus.

Die großen Mycelflocken von *Melanomma* waren braun gefärbt und stark gallertig. Sie schwebten ganz submers in der Nährlösung. Das Mycel blieb in der Kultur ganz steril.

Epicoccum bildete am Boden des Kolbens, ganz submers, große Mycelien, die gelbrot bis purpurrot waren. Sie blieben in der verwendeten Nährlösung vollkommen steril.

Stickstoffgewinn der Kulturen von *Botrytis*, *Melanomma* und *Epicoccum* in Erlenmeyerkolben à 200 ccm Nährlösung mit 0,002 % Kalisalpeter.

Winogradskysche Nährlösung mit 2 % Dextrose
Angesetzt am 7. Juli,
Analysiert am 30. Aug.,
Kulturdauer 53 Tage.

	Botrytis mg	*Melanomma* mg	*Epicoccum* mg
Anfangs-N	**0,57**	**0,57**	**0,57**
Mycel-Gew.	244,0	80,0	146,5
Mycel-N	0,63	0,59	0,41
Filtrat-N	0,40	0,44	0,57
Gesamt-N	1,03	1,03	0,98
N-Gewinn	**0,46**	**0,46**	**0,41**

Absolut sind diese Stickstoffgewinne sehr gering, vergleichen wir sie aber mit den Anfangsstickstoffgehalten, so sind sie diesen fast gleich. Auch *Macrosporium* zeigt bei so geringen Konzentrationen des Anfangsstickstoffs, wie wir oben sahen, ähnliche Werte, so daß wir wohl auch bei diesen Pilzen mit steigendem Zusatz von Stickstoffverbindungen auch ähnliche Werte erhalten hätten, wie wir sie für *Macrosporium* bei höheren Stickstoffkonzentrationen fanden.

Spätere Untersuchungen müssen zeigen, ob es ein Optimum und ein Maximum der Konzentration des Anfangsstickstoffs in bezug auf die Assimilation des elementaren Stickstoffs gebe.

Der Unterschied zwischen der Menge des Stickstoffs im Mycel und derjenigen im Filtrat tritt hier, wie übrigens auch bei *Macrosporium*, bei so niedriger Salpeterkonzentration noch nicht hervor.

Botrytis, *Melanomma* und *Epicoccum* sind bisher noch nie auf Stickstoffassimilation untersucht worden.

6. *Penicillium glaucum* Link, *Aspergillus niger* van Tieghem.

Penicillium bildete teils schwimmende Rasen, die gut und normal fruktifizierten, teils große submerse Flocken, die sich mit zunehmendem Alter rotbraun färbten. Das Mycel war, wie dasjenige von *Aspergillus*, nicht gallertig.

Die Mycelien von *Aspergillus* schwammen auf der Oberfläche der Nährlösung und fruktifizierten sehr gut. Nur wenige sterile Flocken wuchsen submers am Boden der Kolben.

Stickstoffgewinn der Kulturen von *Penicillium* und *Aspergillus* in Erlenmeyerkolben à 200 ccm Nährlösung mit 0,002 % Kalisalpeter.

Winogradskysche Nährlösung mit 2% Dextrose.

Angesetzt am 7. Juli 10,
Analysiert am 30. Aug. 10,
Kulturdauer 53 Tage.

	Penicillium mg	*Aspergillus* mg
Anfangs-N	**0,57**	**0,57**
Mycel-Gew.	58,0	79,8
Mycel-N	0,50	0,50
Filtrat-N	0,57	0,48
Gesamt-N	1,07	0,98
N-Gewinn	**0,50**	**0,41**

Die Zahlen sind ganz ähnlich denjenigen der unter 4. erwähnten 3 Pilze. Was dort erwähnt wurde, gilt ebenso gut für *Penicillium* und *Aspergillus*.

Die beiden Pilze sind schon von einer größeren Anzahl von Forschern auf Stickstoffbindung untersucht worden. Da diese Formen zu den gemeinsten Schimmelpilzen gehören, so mögen einige Angaben solcher Autoren zusammengestellt werden.

Daten von früheren Autoren über Stickstoffbindung durch *Penicillium glaucum* Link.

	Puriewitsch (95, S. 342)	Ternetz (07, S. 353)	Froehlich (08, S. 299)
Kulturdauer in Tagen . . .	60	28	43
Menge der Nährlösung in ccm	50	100	100
Kohlehydrat	25 % Saccharose	5 % Dextrose	5 % Dextrose
Form der N-Verbindung . .	NH_4NO_3	Verunreinigung	Verunreinigung
Anfangs-N in mg	5,1	0,18	0,96
N-Gewinn in mg	3,45	2,63 [1])	1,26
N-Gewinn in % des Anfangs-N	67	1461	131

Die Werte „N-Gewinn in % des Anfangs-N“ von Puriewitsch und Froehlich sind ähnlich wie die meinigen, nur bei der Kultur von Ternetz ist das Verhältnis zwischen Anfangsstickstoff und assimiliertem Stickstoff sehr groß. Ternetz hat aber die Kulturen durchlüftet, was die Stickstoffbindung wohl ganz erheblich begünstigt.

Daten von früheren Autoren über Stickstoffbindung durch *Aspergillus niger*.

a) Ältere Angaben:

	Berthelot (93, S. 847)	Puriewitsch (95, S. 342)	Saida (01, S. 107)	Remy (03, S. 182)
Kulturdauer in Tagen . .	30	60	75	—
Menge der Nährlös. in ccm	600	50	50	1000
Kohlehydrat in mg . .	1 % Weinsäure	5 % Saccharose	17 % Sacchar.	2 % Dextrose
Form der N-Verbindung	Ammontartrat	NH_4NO_3	NH_4Cl	—
Anfangs-N in mg . . .	26,65	2,1	7,39	—
N-Gewinn in mg . . .	7,35	2,20	1,78	10
N-Gew. in % d. Anfangs-N	27	105	25	—

1) Durch die Kultur wurde „von N-Verbindungen freie Luft“ durchgesaugt.

b) Neuere Angaben:

	Ternetz (07, S. 353)	Froehlich (08, S. 299)	Latham (08, S. 235)
Kulturdauer in Tagen . . .	55	39	6
Menge der Nährlösung in ccm	100	100	50
Kohlehydrat	5 % Dextrose	5 % Dextrose	5 % Saccharose
Form der N-Verbindung . .	Verunreinigung	Verunreinigung	NH_4NO_3
Anfangs-N in mg	0,88	0,96	117,2
N-Gewinn in mg	3,33 [1])	(0,46) [2])	205,1
N-Gewinn in % des Anfangs-N	378,4	(48 [2])	174

Auch diese Werte (N-Gewinn in % des Anfangs-N) sind den von mir festgestellten ähnlich. Da Ternetz die *Aspergillus*-Kulturen, wie diejenigen von *Penicillium* durchlüftet hat, so ist auch hier der Stickstoffgewinn im Verhältnis zum Anfangsstickstoff sehr groß.

Besonders interessant sind die Angaben von Latham (08, S. 235). Bei einer Ammoniumnitratkonzentration von fast 1 % (117,2 mg Stickstoff pro 50 ccm) fand er in 50 ccm Nährlösung einen Stickstoffgewinn von 205,1 mg. Es liegt also das Optimum der Stickstoffkonzentration bei *Aspergillus* wohl ziemlich hoch. Latham glaubt dieses Optimum durch folgende Analysenresultate festgestellt zu haben:

Anfangs-N in mg	115,4	117,7	141,6	155,1	156,3	160,3
N-Gewinn in mg	71,5	205,1	1,6	45,0	38,0	— 33,3

Mir scheint aus diesen Zahlen vor allem das hervorzugehen, daß zu einer auch nur angenäherten Bestimmung des Optimums ganz bedeutend mehr Analysendaten nötig sind, da die Zahlen, wie aus der Tabelle leicht zu ersehen ist, sehr stark schwanken. Schon Naegeli (81, S. 287) hat darauf hingewiesen, daß ein und dieselbe Pilzspezies unter ganz gleichen äußeren Bedingungen oft ganz verschieden große Mycelien liefere. Daß dies auch für die Stickstoffassimilation zutrifft, das zeigen die Daten von Latham, auch solche von Froehlich (08) und dem Verfasser.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß nicht nur bei *Aspergillus*, sondern auch bei den übrigen von mir untersuchten Pilzen bedeutend höhere Stickstoffgewinne hätten festgestellt werden können, wenn höhere Anfangsstickstoffmengen verwendet worden wären.

1) Durch die Kultur wurde von N-Verb. freie Luft durchgesaugt.

2) Nur N-Gehalt des Mycels. Filtrat verunglückt, Werte also bedeutend zu niedrig.

Die Dextrosekonzentration wählte ich deshalb so niedrig, weil die Blätter und dürren Stengel keine oder nur sehr wenig lösliche Kohlehydrate enthalten. Beim herbstlichen Laubfall weisen nach A. Fischer (91, S. 90) die Blätter noch geringe Mengen Dextrose auf. Auch ich fand in einem Extrakt von dürren Eichenblättern, nach gründlicher Fällung der Gerbstoffe mit Bleiazetat, noch geringe Mengen eines reduzierenden wasserlöslichen Zuckers. Dem entspricht auch, daß z. B. *Macrosporium* auf einem solchen Extrakt ziemlich gut wächst und fruktifiziert. Übrigens verstehen es diese Pilze, wie einige Kulturen auf einer 1%igen Tanninlösung zeigten, Gerbstoffe, wenn auch ungleich schwieriger als die Kohlehydrate, auszunützen.

Latham (08, S. 238) ist der einzige, der seine Kulturen nur 5 oder 6 Tage wachsen läßt. Alle andern Autoren analysierten ihre Kulturen erst nach 20 oder mehr Tagen nach der Beimpfung. Daß das Alter der Kulturen, sobald die Mycelien ausgewachsen sind, keinen Einfluß mehr auf die Stickstoffbindung hat, das zeigen z. B. einige Kulturen von Froehlich sehr deutlich. *Alternaria tenuis* assimilierte in 3 ganz gleichen Kulturen

in 42 Tagen	. . . . .	4,38 mg N
in 112 „	. . . . .	4,34 „ „
in 212 „	. . . . .	4,31 „ „

Die geringe Bedeutung einer sehr langen Kulturdauer zeigt sich in diesen Zahlen deutlich.

Wir kommen daher zu dem Schluß, daß der Pilz solange Stickstoff bindet, als er wächst und neue Teile bildet. Die ausgewachsenen Mycelpartien assimilieren nicht mehr. Deswegen ändert sich der Stickstoffgehalt in älteren Kulturen auch nicht mehr. Es scheint aber auch keine wesentliche Entbindung des Stickstoffs stattzufinden. Die Fähigkeit der Stickstoffbindung ist eine Funktion des jugendlichen Protoplasmas.

7. Einige Beispiele von Stickstoffbindung bei Bakterien und allgemeine Bemerkungen.

Zum Schluß mögen noch einige stickstoffbindende Bakterien zum Vergleich herangezogen werden.

Nach Mazé (97, S. 48, 49) assimiliert *Bacterium radicicola* auf einem Infus von weißen Bohnen folgende Stickstoffmengen:

Anfangs-N in mg	62,1	22,4	70,7
N-Gewinn in mg	102,9	45,8	118,2

Löhnis und Pillai (02, S. 799) fanden für *Azotobacter chroococcum* auf einem Bodenaufguß mit 1% Mannit:

Anfangs-N in mg	2,24
N-Gewinn in mg	1,96

Für *Clostridium Pasteurianum* konstatierte Winogradsky (zitiert nach Löhnis 10, S. 680) auf Dextrose mit Ammonstickstoff:

Anfangs-N in mg	4,2	6,4
N-Gewinn in mg	5,0	5,5

Daß das Verhältnis des Stickstoffgewinns zum Anfangs-Stickstoff hier ein ganz ähnliches ist, wie bei den stickstoffbindenden Pilzen, ist sehr bemerkenswert. Es wird wohl die Stickstoffbindung bei Bakterien und Pilzen in der gleichen Weise vor sich gehen. Wie dieser Prozeß aber im einzelnen verläuft, ist noch nicht festgestellt worden.

Über mögliche Fehlerquellen sei kurz folgendes bemerkt. Die Nährlösung für alle Kolben einer Serie wurde in einem großen Gefäß hergestellt und nach sorgfältiger Mischung je 200 ccm davon mit einer Pipette in die Kolben gebracht[1]). Nach der Sterilisation wurden alle Kolben beimpft, auch die Kontrollkultur. Letztere wurde zur Abtötung des Impfmaterials noch einmal sterilisiert. Im Zinkkasten standen die Kolben alle nebeneinander und bei der Vorbereitung für die Analysen wurden alle in genau gleicher Weise behandelt. Da die Kontrollkultur einmal mehr sterilisiert werden mußte, so kann dies einen geringen Fehler verursachen, der aber sicher unter der Grenze des analytisch Nachweisbaren liegt, wie die folgende Überlegung zeigt.

Analytisch konnte in der Kontrollkultur ohne Zusatz von gebundenem Stickstoff letzterer nicht nachgewiesen werden, trotzdem ganz sicher noch Stickstoff vorhanden war. Die Dextrose zeigte, wie schon erwähnt, einen Stickstoffgehalt von 2 mg pro 100 g Substanz. Unsere Nährlösung enthielt deshalb noch mindestens 0,08 mg Stickstoff.

1) Die Kulturkolben und alle Gefäße, die mit der Nährlösung in Berührung kamen, wurden kurz vor Gebrauch mit einem heißen Gemisch von konz. H_2SO_4 und CrO_3 behandelt und dann mit Brunnen- und dest. Wasser gut gespült.

Da nach Ternetz (07, S. 400) die Fehlergrenze bei exaktem Arbeiten etwa bei 0,1 mg N liegt, so kann der beim Sterilisieren und bei den späteren Manipulationen aufgenommene Stickstoff nur ganz gering sein und weit unter der analytisch nachweisbaren Menge liegen.

In neuester Zeit hat Medisch (10, S. 627) für *Hypocrea rufa* Stickstoffgewinne festgestellt, die denjenigen, die ich für die obenerwähnten Pilze fand, ganz ähnlich sind. Dieser Autor glaubt, daß nur diejenige Stickstoffmenge, als von dem Pilz assimiliert, angesehen werden darf, die übrig bleibt, wenn man vom Mycel-Stickstoff den Stickstoffgehalt des blinden Versuchs abzieht. Die oft nicht unbedeutenden Stickstoffmengen im Filtrat scheint er als Verunreinigungen anzusehen. Er schreibt u. a.: „es fragt sich, ob sie (die Pilze) überhaupt den freien N assimilieren, oder ob nicht noch unbekannte Fehlerquellen (z. B. aus den Kautschukverbindungen der Gummischläuche, vielleicht aus einem N-Gehalt des Glases) die unbedeutende Zunahme erklären". Die oben gemachten Überlegungen für die N-freie Kultur sprechen ohne weiteres gegen eine solche Vermutung. Übrigens müßten solche „Kautschukverbindungen" usw. ebenso gut die blinden Kulturen verunreinigen und also den Fehler wieder aufheben.

IV. Schlußbetrachtung.

Ed. Henry (08, S. 203—223) verdanken wir wichtige Untersuchungen über die Stickstoffanreicherung im gefallenen Laub der Wälder. Einige seiner Daten mögen kurz wiedergegeben werden.

Nach Chevandier (zitiert nach Henry 08, S. 204) produziert ein Buchenwald pro Jahr und Hektar 3000 kg Holz und 3000 kg Blätter. 3000 kg Buchenholz enthalten ca. 10 kg, 3000 kg Buchenblätter ca. 35 kg Stickstoff. Ein Buchenwald braucht also pro Jahr und Hektar 45 kg Stickstoff. Hiervon erhält der Waldboden jährlich beim herbstlichen Laubfall 35 kg zurückerstattet, während 10 kg für den weiteren Kreislauf des Stickstoffs im Wald verloren sind.

Wurden Blätter der verschiedensten Laubbäume in großen Gefäßen unter sonst natürlichen Bedingungen 1 Jahr lang im Wald gelassen, so zeigten diese einen Stickstoffgewinn von 0,3% im Durchschnitt. Die 3000 kg Blätter würden also pro Jahr und Hektar 9 kg Stickstoff binden, die gerade etwa den jährlichen Verlust decken. Henry (08, S. 213) schreibt diesen Gewinn Mikroorganismen zu,

und da er von „*myriades de microbes*“ spricht, wird er wohl an Bakterien denken.

L. Montemartini (05, S. 1062), Süchting (05, S. 62) und Hornberger (06, S. 775) haben die Resultate von Henry bestätigt. Süchting hat das tote Laub nach stickstoffbindenden Bakterien untersucht und daraus das *Clostridium Pasteurianum* isoliert und Burri (zitiert nach Löhnis 10, S. 677) hat in Laub- und Nadelstreu das *Azotobacter chroococcum* nachgewiesen. Nach diesen beiden Befunden scheint es, daß diesen beiden Bakterien der Stickstoffgewinn in totem Laub zugeschrieben werden müßte. Doch ist zu bemerken, daß nur nach Bakterien gesucht wurde.

Wir verdanken Henry noch eine weitere sehr bemerkenswerte Angabe.

Um die Mitte des letzten Jahrhunderts begann man mit sehr gutem Erfolg die Sanddünen der Gascogne mit Pinus zu bepflanzen. Die Dünen waren vor der Bepflanzung „absolument sans vegetation“ und zeigten keine nachweisbaren Mengen von Stickstoff. Nach 50 Jahren enthielt nach Malepeyre (zitiert nach Henry 08, S. 218) der Sandboden eines solchen Waldes pro Hektar 270 kg Stickstoff, ganz abgesehen von den wohl noch bedeutend größeren Mengen, die in den Bäumen festgelegt waren.

Henry (08, S. 219) hat diese Versuche in Nancy in einem sehr großen Sandbeet nachgeahmt. Er fand, nachdem er 10 Jahre lang *Pinus Laricio* in diesen Beeten kultiviert hatte, im Sand (ohne die oberste Schicht mit den Nadeln) auf ein Hektar umgerechnet 72 kg Stickstoff, also pro Jahr noch etwas höhere Zahlen, als die obenerwähnten.

Dieser Sand war von dem Mycel einer *Cladosporium*-Art vollkommen durchwuchert, „les grains de sable sont comme lissés par ces filements, si bien, que sable et mycelium forment un feutre continu qu'on peut soulever d'une pièce“. Der größte Teil der gebildeten organischen Substanz bestand aus solchen braunen *Cladosporium*-Hyphen. Auch sonst findet sich nach Henry (08, S. 122) *Cladosporium* überall im toten Laub der Wälder sehr häufig.

Ich selbst sah, besonders in Wäldern, folgende Formen oft in sehr großen Mengen, besonders gefällte und geschälte Stämme, tote Blätter und abgestorbene Kräuterstengel überwuchern: *Macrosporium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Hormodendrum*, *Botrytis* und *Bispora*. Für alle diese Formen ist, z. T. schon von mehreren Forschern Stickstoffbindung nachgewiesen worden. Auch in den

obigen sehr bemerkenswerten Sandkulturen von Henry scheint es im höchsten Grade wahrscheinlich, daß jenes *Cladosporium* die gewaltigen Mengen Stickstoff assimiliert hat.

Da diese Pilze, bis zu gewissen, wohl nicht allzu hohen Stickstoffkonzentrationen mit wachsendem Stickstoffgehalt des Substrates, wachsende Mengen von Stickstoff binden, so werden sie wohl auch am natürlichen Standort diese Fähigkeit ausüben.

Aber noch ein anderer Grund scheint mir dafür zu sprechen, daß Pilze zum mindesten einen erheblichen Teil zur Stickstoffanreicherung des Waldes beitragen. Nach Winogradsky (02, S. 53) assimiliert nämlich *Clostridium Pasteurianum* 1,22—1,33 mg Stickstoff pro 1 g verarbeiteter Dextrose, während Froehlich (08, S. 295) für *Macrosporium* 8,92 mg Stickstoff und für *Alternaria* 5,05 mg Stickstoff pro 1 g Dextrose fand. Ternetz (07, S. 385) erhielt sogar für ihre *Phoma*-Arten Werte von 18—22 mg Stickstoff pro 1 g verbrauchter Dextrose.

Gerade in dieser Beziehung sind die Pilze mit ihrer bedeutend ökonomischeren Ausnützung der Kohlehydrate z. B. vor *Clostridium Pasteurianum* ganz entschieden im Vorteil, denn dieses kann seine stickstoffbindenden Eigenschaften im Laub gewiß nur in sehr viel geringerem Maße entwickeln, als in künstlichen Kulturen, in denen ihm reichlich gut assimilierbare Kohlehydrate zur Verfügung stehen.

Die obenerwähnten großen Wälder der Gascogne, an deren Stelle vor einem halben Jahrhundert die ödesten Sanddünen lagen, sind in dieser Beziehung sehr lehrreich. Der junge Waldboden erhielt die ersten erheblichen Mengen organischer Stoffe zugeführt, als die ersten *Pinus*-Nadeln abfielen. Mit solchen geringen Mengen von Kohlehydraten konnten wohl nur Pilze die großen Stickstoffgewinne erzielen, die nötig waren, um das Heranwachsen des jungen Waldes zu ermöglichen.

Diese Vermutungen finden wir in den Sandbeetkulturen von Henry bestätigt, die so sehr von einer *Cladosporium*-Art durchwuchert waren, daß der Sand eine feste, filzige Masse bildete.

Wenn die Pilze im jungen Waldboden wohl vor allem für die Assimilation des Stickstoffs sorgen, so ist man kaum berechtigt, diese Eigenschaft in älterem, humusreicherem Waldboden hauptsächlich oder ganz den Bakterien zuzuschreiben.

Allerdings sind bei der Untersuchung von Laub von 2 Autoren stickstoffbindende Bakterien nachgewiesen worden. Quantitative Angaben über diese Bakterienvorkommnisse finden wir aber nicht.

Dagegen wissen wir, daß Pilze und zwar gerade stickstoffbindende den Waldboden in großer Menge und überall durchwuchern, und daß sie, wie oben ausgeführt, betreffs Stickstoffbindung, im modernden Laub vor den Bakterien entschieden im Vorteil sind.

Was die Brache anbetrifft, so habe ich auf den Stoppeln bei feuchtem Wetter oft beträchtliche Mengen von *Hormodendrum* und *Cladosporium*, auch *Alternaria*, *Macrosporium* und *Phoma*-Arten gefunden. Es ist auch bei der Brache nicht unwahrscheinlich, daß ein Teil des gewonnenen Stickstoffs den Pilzen zuzuschreiben ist. Doch ist zu bemerken, daß die Pilzflora der Brache quantitativ derjenigen des Waldes lange nicht gleichkommt, schon wegen der geringeren und weniger konstanten Luftfeuchtigkeit.

Wir kommen zu dem Schluß, daß wenigstens im Wald die von Henry und andern nachgewiesene Stickstoffbindung im modernden Laub hauptsächlich stickstoffassimilierenden Pilzen zuzuschreiben ist, die nachgewiesenermaßen das tote Laub und den Humus der Wälder in großen Mengen bewohnen.

Die Pilze, die bis jetzt auf Stickstoffassimilation untersucht worden sind, sind europäische Arten, *Penicillium* und *Aspergillus* sind Ubiquisten. Es scheint mir nicht unwahrscheinlich, daß sich in den Tropen Pilze finden lassen, die noch bedeutend energischer den ungebundenen Stickstoff assimilieren. Der Kreislauf der Stoffe ist in den Tropen ein viel intensiverer als bei uns, es wird durch Fäulnis mehr Stickstoff in Freiheit gesetzt und daher muß wohl auch bedeutend mehr assimiliert werden, da die Stickstoffbilanz, so viel wir bemerken können, sich ungefähr konstant hält. Dem würde entsprechen, daß in Griechenland und Ägypten (Kette, Leo Anderlind zitiert nach Löhnis 10, S. 695) die Felder trotz intensiver Bebauung keiner Düngung bedürfen, und Bergteil (06, zitiert nach Löhnis 10, S. 695) hat ähnliches für Indien nachgewiesen, indem er zeigte, daß trotz des geringen Bodenstickstoffs dauernd reiche Ernten erzielt werden konnten, ohne jede Stickstoffdüngung.

Zusammenfassung der Resultate.

1. Die 54 isolierten Pilze wachsen auf Agar ohne Zusatz von Stickstoffverbindung meist gut z. T. sehr gut, während sie auf sehr stickstoffarmem Substrat mit wenigen Ausnahmen nur kümmerlich gedeihen. Der N-Gehalt des Nährbodens mit Agar betrug 0,025%, der mit Kieselsäure etwa 0,0001%.

2. Nach dem Wachstum auf Kieselsäuregallerte lassen sich die untersuchten Pilze in folgende 3 Gruppen einteilen:
   a) Kaum wachsend, ganz steril, sehr viel Öl. 25 Pilze.
   b) Etwas besser wachsend, steril oder wenige Anfänge von Fruktifikation, viel Öl. 22 Pilze.
   c) Relativ gut wachsend, z. T. sehr gut fruktifizierend, wenig Öl. 5 Pilze.
3. Für 9 Pilze ist Bindung des elementaren Stickstoffs festgestellt worden:
   Macrosporium commune Rbh.; *Alternaria tenuis* Nees.; *Hormodendrum cladosporioides* Sacc.; *Botrytis cinerea* Pers.; *Bispora molinioides* Corda; *Epicoccum purpurascens* Ehrenberg; *Aspergillus niger* van Tieghem; *Penicillium glaucum* Link; *Melanomma* spec.

   Für folgende Pilze ist schon von andern Autoren Stickstoffassimilation nachgewiesen worden:
   Macrosporium; Alternaria; Hormodendrum; Aspergillus; Penicillium.

   Als neue stickstoffbindende Formen wurden konstatiert:
   Botrytis; Bispora; Epicoccum; Melanomma.
4. Bei Gegenwart geringer Anfangsstickstoffmengen in der Nährlösung nimmt die Bindung des elementaren Stickstoffs bei den vier daraufhin untersuchten Pilzen etwa proportional der Anfangsstickstoffmenge zu. Bei *Macrosporium, Alternaria* und *Hormodendrum* ist das Verhältnis von gebundenem Stickstoff zum Anfangsstickstoff etwa gleich 100 %, für *Bispora* etwa gleich 35 %. Die prozentualen Werte nehmen aber mit steigendem Stickstoffgehalt der Nährlösung eher noch etwas zu.
5. Den Pilzen ist im großen Kreislauf des Stickstoffs, sowohl wegen ihrer Häufigkeit, als auch wegen ihrer ökonomischeren Verwertung der Kohlehydrate eine bedeutende, im Wald sogar die Hauptrolle zuzuschreiben.

Die vorliegende Arbeit wurde im botanischen Institut der Universität Basel auf Anregung und unter Aufsicht von Herrn Prof. Dr. Alfr. Fischer ausgeführt. Ich möchte auch an dieser Stelle meinem verehrten Lehrer für das meinen Untersuchungen stets entgegengebrachte Interesse, für die vielen wertvollen Ratschläge und für die mir zur Verfügung gestellten Hilfsmittel meinen herzlichsten

Dank aussprechen. Auch Herrn Otto Wolf möchte ich für die Gewissenhaftigkeit und Sorgfalt, mit der er die Analysen ausgeführt hat, bestens danken.

Literatur-Verzeichnis.

Beijerink, M. W., Das Assimilationsprodukt der Kohlensäure in den Chromatophoren der Diatomaceen. Rec. trav. bot. neerland I, 1904.

Berthelot, M., Recherches nouvelles sur les microorganismes fixateurs de l'azote libre. Compt. rend., Paris 1893, Bd. 116.

Brefeld, O., I. Bot. Untersuchungen über Schimmelpilze, Bd. 6—10.

— II. Versuche über N-Aufnahme bei den Pflanzen. Jahresber. d. schlesischen Ges. f. vaterländ. Kultur, 1900, Bd. 78.

Czapek, Fr., I. Biochemie der Pflanzen, Bd. II, 1905.

— II. Untersuchungen über die Stickstoff-Gewinnung und Eiweißbildung der Schimmelpilze. Beiträge zu chem. Physiol. u. Pathologie 1902, Bd. 2.

Ebermayer, E., Physiol. Chemie der Pflanzen, 1882.

Fischer, A., Beiträge zur Physiol. der Holzgewächse. Jahrb. f. wiss. Bot., 1891, Bd. XXII.

Fermi, C., N-freie Organismen und Enzyme? Centralbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. 2, 1896.

Frank, B., Stickstoffbindung in der Pflanzenwelt. Bot. Zeitg., 1893, Bd. 51.

Froehlich, H., Stickstoffbindung durch einige auf abgestorbenen Pflanzenteilen häufige Hyphomyceten. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. XLV, 1908.

Gerlach und Vogel, Weitere Versuche mit N-bindenden Bakterien. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 10, 1903.

Gmelin-Krauts Handbuch der anorgan. Chemie, 1908, Bd. III, Abt. 1.

Guéguen, Recherches morphologiques et biologiques sur quelques *Stysanus*. Bull. Soc. Mycol. France, Bd. 19, 1903.

Henry, Ed., Les sols forestiers, Nancy 1908.

Hornberger, Streu und Stickstoff. Zeitschr. f. Forst- und Jagdwesen, 1906.

Keding, M., Weitere Untersuchungen über stickstoffbindende Bakterien. Wissenschaftl. Meeresuntersuchungen, Abt. Kiel, Neue Folge, Bd. IX, 1906.

König, J., Chemie der menschl. Genuß- und Nahrungsmittel, 1903.

Koch, A., Die Bindung von freiem Stickstoff durch freilebende niedere Organismen. Lafars Handbuch der techn. Mycologie, Bd. III.

— N-Bindung durch Leguminosen. Verhandlungen der Gesellsch. deutscher Naturforscher und Ärzte, 1903, I.

Latham, M. E., Nitrogen assimilation of *Sterigmatocystis (Aspergillus) nigra* and the effect of chemical stimulation. Bull. of the Torrey Botanical club, Bd. 36, 1909.

Löhnis, Handbuch der landwirtschaftlichen Bakteriologie, 1910.

Mazé, Microbes des nodosités des Legumineuses. Ann. de l'institut Pasteur, Bd. 11, 1897.

Medisch, M., Beiträge zur Physiologie der *Hypocrea rufa*. Jahrb. f. wissensch. Bot., 1910, Bd. XLVIII.

Montemartini, Le fissazione del'azoto atmospherico durante la decomposizione delle foglie cadute dagli alberi. Le stazioni sperimentali agrarie italiane Bd. 38, 1905.

Nägeli, C., Fettbildung bei niederen Pilzen. Bot. Mitteil., Bd. III, 1881.

Omelianski, Über die Isolierung der Nitrifikationsmikroben aus dem Erdboden. Ctrlbl. für Bact., II. Abt., Bd. 5, 1899.

Otto, R., Die chemische Zusammensetzung des einjährigen Holzes der Obstbäume usw. Bot. Centralbl., Bd. 86, 1901.

Puriewitsch, K., Über die Stickstoffassimilation bei den Schimmelpilzen. Ber. der Deutsch. Bot. Ges., 1905, Bd. 13.

Remy, N-Bindung durch Leguminosen. Verhandl. d. Ges. deutscher Naturforscher und Ärzte, 1903, I. Teil.

Saida, K., Über die Assimilation des freien Stickstoffs durch Schimmelpilze. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1901, Bd. 19.

Stevens and Temple, A convenient mode of preparing silicate jelly. Centralbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. 21, 1908.

Süchting, H., Die Assimilation des freien Stickstoffs im toten Laub der Waldbäume. Hannov. Landw. Ztg., 1905, Bd. 58.

Ternetz, Ch., Über die Assimilation des atmosphärischen Stickstoffs durch Pilze. Jahrb. f. wiss. Bot., 1907, Bd. XLIV.

Winogradsky, Recherches sur les organismes de la nitrification. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., 1891, Bd. 5.

Wollny, E., Zersetzung der organischen Stoffe und die Humusbildung, 1897.

Inhaltsübersicht.

Seite

I. Isolierung und Kultur der Pilze auf Agar ohne Zusatz von gebundenem Stickstoff 1

II. Kultur auf Kieselsäuregallerte ohne gebundenen Stickstoff 7

1. Darstellung der Kieselsäure 7

2. Wachstum der Pilze auf den Kieselsäure-Platten ohne Zugabe von Stickstoffverbindungen 11

III. Quantitative Analysen von Kulturen mit stickstofffreier und stickstoffhaltiger Nährlösung 16

1. *Macrosporium commune* 20

2. *Hormodendrum cladosporioides* 22

3. *Alternaria tenuis* 23

4. *Bispora molinioides* 24

5. *Botrytis cinerea, Melanomma, Epicoccum purpurascens* 25

6. *Penicillium glaucum, Aspergillus niger* 26

7. Einige Beispiele von Stickstoffbindung bei Bakterien und allgemeine Bemerkungen 29

IV. Schlußbetrachtung 31

Zusammenfassung der Resultate 34

Literatur-Verzeichnis 36

VITA.

Gerold Stahel von Elgg (Kt. Zürich) wurde am 29. Juni 1887 als Sohn des Pfarrers Stahel-Keller (z. Z. wohnhaft in Oberglatt, Kt. Zürich) in Gossau (Kt. Zürich) geboren. Er besuchte das untere Gymnasium in Basel, das obere von 1902—1906 in Schiers (Kt. Graubünden) und bestand 1906 das Maturitätsexamen des Kantons Graubünden. Er studierte an der Universität Basel vom S.-S. 1906 bis zum W.-S. 1911. Er besuchte die Vorlesungen der Herren Professoren und Dozenten: Alfr. Fischer, Hagenbach-Bischoff, Aug. Hagenbach, C. Schmidt, F. Zschokke, A. Riggenbach, G. Senn, Fr. Fichter, H. Rupe, H. Zickendraht, E. Reinle, J. Shawcross, die Praktika der Herren Professoren und Dozenten: Alfr. Fischer, Aug. Hagenbach, C. Schmidt, F. Zschokke, G. Senn, Fr. Fichter, H. Veillon, H. Preiswerk, H. Zickendraht. Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung des Herrn Prof. Dr. Alfr. Fischer. Der Verfasser ist seit dem S.-S. 1910 als Assistent am botan. Institut in Basel tätig.